

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520111153345

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

三氧化二砷在异种胰岛移植中作用研究

Study of Arsenic Trioxide in Islet Xenotransplantation

李家丽

指导教师姓名: 齐忠权 教授

专 业 名 称: 药 理 学

论文提交日期: 2014 年 5 月

论文答辩日期: 2014 年 5 月

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（免疫抑制剂）课题（组）的科研成果，获得（齐忠权教授）课题（组）经费或实验室资助，在（厦门大学器官移植研究所）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不做特别声明。

声明人（签名）：

2014 年 5 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国硕士、博士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其他方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

☐ 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

☒ 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

2014 年 月 日

目 录

摘 要.....	V
Abstract.....	VI
第一章 前言	1
1.1 胰岛移植.....	2
1.1.1 同种异体胰岛移植.....	2
1.1.2 异种胰岛移植.....	3
1.2 胰岛移植排斥反应.....	5
1.2.1 T 细胞与胰岛移植	6
1.2.2 B 细胞与胰岛移植	7
1.3 胰岛移植中免疫抑制剂的应用	9
1.3.1 化学免疫抑制剂：环孢菌素 A 他克莫司 西罗莫司	9
1.3.2 新型中药来源的免疫抑制剂的开发：雷公藤多苷、FTY-720、三氧化二砷（Arsenic trioxide, As ₂ O ₃ ）	11
1.4. 研究的目的、意义、内容	12
第二章 材料与方法	14
2.1 实验材料.....	14
2.1.1 实验动物.....	14
2.1.2 实验仪器.....	14
2.1.3 试剂.....	14
2.2 实验方法	16
2.2.1 大鼠及小鼠胰岛的分离与纯化.....	16
2.2.2 胰岛 DTZ 染色.....	17
2.2.3 胰岛细胞活性检测.....	17
2.2.4 糖尿病小鼠模型建立.....	18
2.2.5 胰岛肾被膜下移植.....	18
2.2.6 用药方案.....	19
2.2.7 细胞免疫学研究方法.....	20

2.2.8 分子生物学研究方法.....	23
2.3 统计学分析.....	26
第三章 结果与讨论	27
3.1 胰岛移植模型的建立.....	27
3.1.1 胰腺灌注、胰岛提取、胰岛移植过程.....	27
3.1.2 胰岛形态学观察、纯度鉴定及活性检测.....	27
3.1.3 糖尿病小鼠模型建立及胰岛移植.....	28
3.2 As ₂ O ₃ 在异种胰岛移植中的作用	29
3.2.1 As ₂ O ₃ 能够延长异种胰岛移植生存期	29
3.2.2 As ₂ O ₃ 能够诱导脾细胞凋亡	31
3.2.3 As ₂ O ₃ 用药后对受者淋巴结 CD4、CD8 比例影响	31
3.2.4 As ₂ O ₃ 用药后对异种胰岛移植 Th1/Th2 免疫类型的影响	32
3.2.5 As ₂ O ₃ 用药后对异种胰岛移植体液免疫的影响	33
3.3 As ₂ O ₃ 联合 RAPA 在异种胰岛移植中的作用	34
3.3.1 As ₂ O ₃ 联合 RAPA 在同种和异种胰岛移植中的生存期.....	34
3.3.2 同种异体胰岛移植和异种胰岛移植对比研究.....	36
3.3.3 As ₂ O ₃ 联合 RAPA 用药后对异种胰岛移植体液免疫的影响.....	44
第四章 结论与展望	45
附 录.....	47
参 考 文 献	50
致 谢.....	59

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	V
Abstract in English	VI
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Islet transplantation	2
1.1.1 Islet allotransplantation	2
1.1.2 Islet xenotransplantation	3
1.2 The rejection in islet transplantation.....	5
1.2.1 T cells in islet transplantation	6
1.2.2 B cells in islet transplantation	7
1.3 Immunosuppressive agents used in islet transplantation	9
1.3.1 Chemical immunosuppressive agents: cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus.....	9
1.3.2 The development of novel traditional Chinese medicine immunosuppression sources: Tripterygium Glycosides, FTY-720 and Arsenic trioxide.....	11
1.4 Purpose, significance and contents of this study	12
Chapter 2 Materials and Methods	14
2.1 Materials.....	14
2.1.1 Animals	14
2.1.2 Main instruments	14
2.1.3 Main reagents.....	14
2.2 Methods	16
2.2.1 Isolation and purification for islet cells of rat or mice	16
2.2.2 Islet stain with DTZ	17
2.2.3 The activity of isolated islets	17
2.2.4 Model of the diabetic mice	18
2.2.5 Model of islet transplantation	18
2.2.6 Drugs for immunosuppressive strategies	19

2.2.7 Methods related to cells	20
2.2.8 Methods related to molecular biology	23
2.3 Statistical analysis.....	26
Chapter 3 Results and discussion.....	27
3.1 Model of islet transplantation	27
3.1.1 Isolation, purification and identification for islets	27
3.1.2 Morphology、purity and activity of the islet	27
3.1.3 Model of diabetic mice and islet transplantation	28
3.2 Role of As₂O₃ in islet transplantation	29
3.2.1 As ₂ O ₃ could prolong the survival of islet xenografts	29
3.2.2 As ₂ O ₃ induced the splenocytes apoptosis	31
3.2.3 CD4 and CD8 in lymph nodes after As ₂ O ₃ administration.....	31
3.2.4 Cytokines in the sera and MLR supernatant after As ₂ O ₃ administration.....	32
3.2.5 Donor specific antibodies in the sera after As ₂ O ₃ administration.....	33
3.3 As₂O₃ combined with RAPA in islet xenotransplantation.....	34
3.3.1 The survival of As ₂ O ₃ combined with RAPA in islet allografts and xenografts.....	34
3.3.2 The comparison between islet allotransplantation and xenotransplantation	36
3.3.3 Humoral immune response after As ₂ O ₃ combined with RAPA administration	44
Chapter 4 Conclusion and Prospect.....	45
Appendix.....	47
References	50
Acknowledgements	59

摘要

背景: 糖尿病可行有效的治疗方法之一是胰岛移植, 现今临床同种免疫抑制剂得到极大发展使得部分移植患者术后长期生存过上类似正常人生活, 但是依然有大部分患者达不到理想免疫抑制效果并且忍受着免疫抑制剂的诸多副作用。同时供体不足限制了胰岛移植的发展, 异种移植就能解决这个问题。虽然异种来源的胰岛细胞较充足, 但异种移植面临的排斥反应机制非常复杂, 目前对异种移植排斥都没有得到充分的认识, 限制了临床异种移植发展的进程。因此我们目前亟需认识同种和异种移植的差别并开发适用于异种移植的免疫抑制剂。

方法: 我们提取出 Lewis 大鼠胰岛, 然后进行 Lewis 大鼠到 C57BL/6 小鼠肾被膜下的胰岛移植。首先, 我们尝试开发中药传统药物 As_2O_3 , 研究其在异种胰岛移植中的作用。其次, 为了达到更理想的效果, 我们把 As_2O_3 和 RAPA 联合应用于异种胰岛移植, 探讨两者联合应用效果及其机制。

结果: Lewis 大鼠到 C57BL/6 小鼠(对照组)的胰岛移植中位生存期(median survival time, MST)为 12 天, As_2O_3 组中位生存期 15 天, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 As_2O_3 通过诱导脾细胞凋亡和降低血清中 $\text{IFN-}\gamma$ 水平发挥作用。 As_2O_3 联合 RAPA 中位生存期 28 天, 而前期同种移植联合用药组有 2/6 生存期超过 100 天。异种移植联合用药效果不如同种胰岛移植主要是因为异种胰岛移植排斥较同种胰岛移植强烈尤其是体液免疫更为明显。 RAPA 联合 As_2O_3 组在排斥时间点 IgG 抗体处于高水平。

结论: As_2O_3 能够延长异种胰岛移植生存期; As_2O_3 能够诱导脾细胞凋亡、降低部分细胞免疫水平, 但不能降低体液免疫水平。异种胰岛移植 As_2O_3 联合 RAPA 应用不能对抗体液免疫反应。

关键词: 异种胰岛移植 免疫抑制 三氧化二砷

Abstract

Background: Islet transplantation is an effective method to treat diabetes. The great progress of the clinical immunosuppressant makes some long-term survival patients after allotransplantation live a life as ordinary people. But the majority of the patients still can not achieve ideal immunosuppressive effect and endure the side effects of immunosuppressants. Meanwhile, the lack of donor hinders its development and islet xenotransplantation can solve this problem. Although heterogeneous islet source is adequate, the mechanism of xenotransplantation rejection is very complex and we know less about it and the development of clinical xenotransplantation is restricted. As a result, we now urgently need to know the difference between allotransplantation and xenotransplantation and then develop suitable immunosuppressants for xenotransplantation.

Methods: We isolated the islets from Lewis and then transplanted them under the renal capsule of diabetic C57BL / 6 mice. Firstly, we tried to develop the traditional Chinese medicine As_2O_3 as a novel immunosuppressor in islet xenotransplantation. Secondly, we tried to use As_2O_3 combined with RAPA to get a better result and explored the mechanism. The combination we did before in islet allotransplantation had an ideal effect.

Results: Lewis rat islet xenografts transplanted in diabetic C57BL/6 mice (control group) showed a median survival time (MST) of 12 days. As_2O_3 group showed a median survival of 15 days and it was statistically significant compared with control group. As_2O_3 combined with RAPA group showed a median survival of 28 days which we used before in allotransplantation showed more than 100 days survival in 2/6. The effect of combination group in xenotransplantation was not as better as in allotransplantation was mainly due to the more strong immune rejection especially the humoral immune rejection. As_2O_3 combined with RAPA group showed a high level of IgG at the rejection point.

Conclusion: As_2O_3 could prolong the survival of islet xenografts for several days. As_2O_3 could also induce the apoptosis of spleocytes and decreased part of the cellular immune but not the humoral immune. Neither did As_2O_3 combined with

RAPA could decrease the humoral immune response.

Keywords: islet xenotransplantation; immunosuppression; arsenic trioxide

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病，是当今威胁人类健康的三大疾病之一。糖尿病时胰岛素相对或绝对缺乏，导致高血糖，进而引起种组织和器官损害，有诸多的并发症。尤其是眼部、心脏、肾脏、血管和神经的并发症。2010年，中国男女性糖尿病患病率大规模流行病学调查结果在《新英格兰医学杂志》报道，该报道认为中国已成为仅次于印度的世界第二糖尿病大国^[1-3]。糖尿病权威数据来源的国际糖尿病联合会（IDF）三年后显示中国糖尿病患者数已经达到9800万，远超过印度6600万的数量，成为糖尿病第一大国，而美国糖尿病患者数量居全球第三，为2440万。同时IDF指出，2013年全球糖尿病患者高达3.82亿；根据发展趋势，预计到2035年，全球糖尿病患者将达到5.92亿。

目前临床糖尿病治疗主要方法主要有胰岛素注射，口服降糖药物配合健康生活习惯。但是这些方法都是外来外来降糖物质所作用，不同于机体自身的糖代谢调节，不符合生理节律，很容易引起糖代谢紊乱，甚至引发低血糖等严重并发症，有的患者因此而丧命。最好的治疗糖尿病的方法就是患者机体能够根据自身血糖水平感受和调节糖代谢，这就是胰腺移植和胰岛移植。其中胰腺移植并发症多，手术难度大，安全性低，移植物携带过客淋巴细胞，而胰岛移植则可以克服这些困难。胰岛移植成为未来在治疗糖尿病终末期的理想方法^[4]。

然而，胰岛移植也面临了巨大的挑战，其中的挑战就包括免疫排斥和移植供体的缺乏。异种来源的胰岛则能够克服来源不足的问题，但是其同样不可避免免疫排斥问题而且其免疫排斥程度更加剧烈。目前临床应用的免疫抑制剂在对抗免疫排斥方面虽有很大进步，但同时有肾毒性、致糖尿病等副作用。在胰岛移植方面，尤其要避免胰岛毒性的药物，20世纪90年代发现了许多不影响胰岛细胞功能的新免疫抑制剂，其中，中药类免疫抑制剂发展很快。本章将叙述胰岛移植、移植排斥相关知识以及目前临床免疫抑制剂应用现状，进而引出本论文的研究目的和意义。

1.1 胰岛移植

1966 年 Kelly 和 Lillehei 探索了世界首例胰腺移植^[5]，随后胰腺移植不断取得进展，但是胰腺移植仍然有自身的局限，如手术难度较大；术后常发生感染胰漏等并发症；胰腺是敏感器官，对供体要求高；难以处理外分泌腺引流问题等。胰岛移植与上述两种治疗糖尿病的方法相比，具有许多优势：1、胰岛移植手术简单对患者刺激少，并发症低，反复多次移植对患者创伤也不会很大；2、胰岛移植内容单纯，腺泡以及胶原结缔组织等杂质很少，免疫原性低，而且可以在体外进行修饰，如进行免疫隔离或者基因修饰等更加能够降低其免疫原性；3、胰岛移植不受供体体型或者年龄甚至物种的限制，来源广泛^[6-10]，并且提取的胰岛还能够长期保存，必要时再进行移植。

胰岛移植正在迎来一个崭新的时代，但同时胰岛移植同样也面临着问题：①供体短缺；②提取过程中胰岛失功；③免疫排斥作用使得移植的胰岛逐渐失去功能；④胰岛移植重建血管困难，移植物营养供给不足而坏死失功。针对这些问题，我们也探索出相应的对策：①同种供体提高胰岛分离纯化的效率和活性，使尽量少的供体就能满足一个受体的需要；另外寻找供体来源，如利用异种胰岛或胰岛干细胞；②进一步提高消化酶的特异性和活性；改善培养条件和提取其他条件；③进行移植物免疫隔离；诱导免疫耐受；寻找较小毒副作用的免疫抑制治疗方案，使移植物既能克服免疫排斥反应，又不对其他器官有损伤④选择最佳移植环境；移植同时进行基因修饰促进血管再生。

1.1.1 同种异体胰岛移植

由于胰岛移植比全胰腺移植更简单、更安全，可望成为未来治疗 1 型糖尿病的根本方法，其也是当今糖尿病治疗领域的一个主流研究方向。1967 年，Lacy 和 Kostianovsky 开创了啮齿类动物胰岛提取的先锋^[11]，1972 和 1973 年，Ballinger 和 Reckard 的两个实验室几乎同时独立地报道了啮齿类动物移植后逆转糖尿病高血糖的情况^[12, 13]。从那以后，一系列治疗 I 型糖尿病的里程碑式的新发现不断开辟：包括 1) 选择通过肝门静脉进入肝脏的方式作为分离的胰岛移植部位^[14]；2) 机器自动化的分离人胰腺中的胰岛细胞^[15]；3) 使用胶原酶分离和纯化分离的胰

岛^[16]。1971 年 Ashcroft 等首次进行了人胰岛分离^[17]，后人们进行了人胰岛移植的探索，于 1974 年开始同种异体人胰岛移植^[18]，并使部分患者在胰岛移植后减少了对胰岛素的依赖。虽然胰岛移植在 20 世纪八十年代后陆续取得进展，但是但远期治疗效果不乐观^[19]。国际胰岛移植登记中心（ITR）的数据表明 2003 年之前的 30 年间全球共完成成人胰岛移植 705 例，这其中有 1990 至 2003 年进行的 615 例病例^[20]。但 1999 年之前，有 447 例患者接受同种异体胰岛移植的，其中仅 10% 的患者能够脱离外源胰岛素治疗满 1 年^[21]，而同期数据显示胰腺移植一年胰岛素非依赖达到 80% 以上。2000 年六月，Shapiro 教授等在加拿大埃德蒙顿阿尔伯塔大学推出了埃德蒙顿方案，该方案使得 7 位患者术后百分之百的脱离了胰岛素^[6]，术后一年仍然有 80% 患者胰岛素非依赖^[22, 23]，因此这一方案成为胰岛移植获得里程碑式进展的标志。该方案最关键的成功因素在于移植了大量的胰岛和使用不含糖皮质激素的免疫抑制方案^[6]。但是 2006 年，埃德蒙顿方案在全球 9 个国家 36 位进行胰岛移植的患者身上进行跟踪，发现只有 16 (44%) 位患者达到移植后一年胰岛素非依赖，10 (28%) 位患者移植胰岛 1 年后有部分功能，10 (28%) 位患者移植 1 年后完全丧失胰岛功能^[7]。因此，同种异体胰岛移植虽然从开创以来取得了巨大进步，但是作为一种尚未成熟的新型糖尿病治疗技术，由于影响因素杂而多，故其广泛运用面临了诸多瓶颈。在这些瓶颈中，有两个最为关键的制约因素，即免疫移植排斥反应和胰岛来源的不足^[10]，因此探索抑制免疫排斥的方案以及寻找新的胰岛来源成为人们追求的目标。

1.1.2 异种胰岛移植

为了解决同种异体胰岛移植供体短缺问题，人们想到了异种来源的供体以及干细胞诱导发育而成的胰岛细胞。干细胞诱导而成的胰岛移植虽然前景光明，但因技术限制，干细胞分化为有功能胰岛目前还没有相关报道，并且干细胞本身多重性质例如具有致癌性等不安全因素也影响干细胞的应用。因此，我们目前最紧要的是寻找合适的供体来源解决胰岛移植供需矛盾^[24]，美国器官供应移植网络（OPTN）数据显示，截止 2014 年 2 月，美国有超过 132000 位患者在等待合适的器官进行移植。而中国卫计委负责人近日表示中国的器官移植供需比例为 1:30。

最早的关于异种移植的报道是 Reemtsma 报道的 1964 年移植了黑猩猩的肾

给一位肾病末期患者,延长了这位患者 9 个月的生存期^[25]。异种移植物来源丰富,有助于解决临床上同种异体供体器官不足的问题^[26]。虽然异种胰岛移植的大门已经打开,但现今的临床异种移植应用也只有胰岛移植^[27],众多异种器官移植都处于临床前研究阶段。猪胰岛素与人胰岛素仅有一个氨基酸存在差异,而且猪来源方便而众多,因此猪来源的胰岛 β 细胞有望成为今后人类胰岛移植的主要供体^[28]。猪胰岛异种移植不仅能解决人源供体来源严重不足的问题,而且与人胰岛相比,在供体年龄、IR、伴随疾病等方面具有相对可控的优势。异种移植最能模拟临床数据的是猪到非人灵长类(NHPs)的临床前研究。在猪到 NHPs 胰岛移植模型中,面临多种不同类型的免疫排斥反应,包括 HAR、AHXR、ACXR、AVR、TMA 等,远比同种异体移植排斥复杂得多。使用基因修饰的方法,对供体或移植物进行基因改造,可以从根本上有利于异种移植的成功。除此之外,仍需要合适的移植手术方案优化以及免疫抑制和耐受诱导方案。目前,已有 15 个研究单位报道过猪到 NHPs 的异种胰岛移植研究^[29],但其中只有极少数可以实现移植术后 3 个月内仍保持不需要外源胰岛素的状态。这些成果一方面表明了猪胰岛异种移植具有治愈糖尿病 NHPs 的潜力,可以为将来的临床应用打下良好的基础,另一方面也表明目前仍未找到最为有效的免疫抑制及耐受诱导策略。

此外,由于存在伦理和传染风险问题,同时灵长类动物体内有预存抗猪的 α -1,3 半乳糖苷酶抗体,猪作为异种移植物供体有诸多障碍需要克服^[30, 31]。因此猪能够作为异种供体来源给人类进行移植,虽然给人们带来了希望,但是也带来了担忧。猪内源性逆转录病毒(PERV)体外实验表明能够感染人的细胞,因此人们担心猪移植给人后是否会引发新的流行性传染疾病^[32-34]。2003 年的第七届异种移植大会上有人报道了关于目前以猪为供体的异种移植安全性问题的重要资料,发现在应用与临床免疫抑制相似的治疗方案中,给予大剂量 PERV 均不能使狒狒感染,表明 PERV 和非人灵长类动物不存在交叉感染的问题^[35-37]。截止目前为止,也还没有进行了猪作为供体的异种移植受体发生 PERV 感染的报道。PERV 传播要经过逆转录和 DNA 复制转录过程,DNA 甲基化是公认的能够抑制转录。MATOUSKOVA^[38]等最新研究认为猪组织长端重复序列有高度甲基化修饰,只有极小的片段没有被甲基化而引起猪体内病毒的传播。同时,PERV 病毒 RNA 经逆转录整合到猪 DNA 后呈现高度多态性,通过猪群体基因测序寻找

PERV 基因, 发现有这种病毒有 20 个基因组, 而在 120 头猪基因测序中没有发现一头猪有完整的 20 个病毒基因组, 表明单个供体猪是不能够导致病毒复制传播的^[39]。

1.2 胰岛移植排斥反应

如前所说, 胰岛移植面临多重困难, 移植的胰岛能否发挥功能, 一方面取决于提取胰岛本身功能是否完好, 另一方面取决于移植后的环境。移植后的环境影响胰岛功能主要是两方面, 一是移植环境是否有充分的营养供应, 以免移植胰岛缺氧坏死, 另一方面则是由于排斥反应的强弱^[40, 41]。参与胰岛移植排斥反应的细胞是多种多样的。总的来说包括固有免疫反应和适应性免疫应答。固有免疫反应大部分是由单核巨噬细胞、NK 细胞以及补体完成的, 多数的胰岛细胞移植到宿主体内后被巨噬细胞攻击吞噬、直接被 NK 细胞攻击、补体通过补体途径发挥其免疫功能而失去胰岛功能, 适应性免疫应答类型中细胞免疫和体液免疫均参与了胰岛细胞移植后的排斥。在细胞免疫中, CD4 与 CD8 均参与同种和异种的胰岛移植排斥^[42]且为主要的排斥角色, 体液免疫在胰岛移植中参与较为复杂, 其中适应性产生的抗体主要为后期的参与者^[43, 44], 而宿主体内预先存有的对抗供着的抗体则在移植最早期参与移植排斥^[45]。

目前临床上的器官移植主要限于同种异体移植。根据供受者基因背景的不同可以分为同基因移植, 包括自体 and 异体同基因移植 (同卵双生间的移植), 同种异基因移植和异种移植。移植排斥反应主要发生在后两种移植情况, 表现为受者免疫系统攻击移植器官或组织, 其本质是机体通过自身免疫系统识别并清除非己的免疫反应。解决移植排斥难题对促进器官移植进步有重大而深远的意义。移植排斥反应根据不同的发生机制和组织学特点分为不同的类型; 包括超急性排斥、急性排斥、慢性排斥以及加速性排斥反应四大类。超急性排斥, 是由于受者体内预存在抗供者抗体而激发的一种补体依赖性的应答 (例如, ABO 血型抗原, 血小板抗原, HLA 抗原等)^[45], 又称为抗体介导的排斥反应。而针对异种移植, 尤其是猪来源的猪到人或者猪到灵长类动物移植, 超急性排斥反应发生的最主要因素就是存在于异种移植物内皮表面的 α Gal 异种抗原表位^[46, 47]。急性排斥反应

是最常见的一种移植排斥反应，一般发生在移植术后几个小时至几个月内，病理检查可见大量炎性细胞尤其是淋巴细胞和单核巨噬细胞。患者可见发热、全身不适、移植部位疼痛等症状，实验室移植物功能相关指标检查功能异常^[48]。CD4⁺T 细胞中的 Th1 细胞介导的免疫排斥作用是造成移植物功能障碍的主要原因^[49]。受者 T 淋巴细胞在受到移植物的抗原刺激后产生增殖，同时分化为大量具有供者特异性的致敏淋巴细胞，通过释放各种炎性因子杀伤移植物细胞或通过颗粒酶、穿孔素途径直接杀伤靶细胞，导致移植物排斥。加速性排斥反应介于超急性和急性排斥反应之间，发生于移植后 1 周之内，排斥反应进展迅速。移植物常表现为功能恢复后，突然出现肿胀功能迅速减退。慢性排斥反应机制则比较复杂，参与者众多。CD4⁺T 细胞通过间接途径识别移植物表面 MHC 抗原而被活化，分化为两种不同功能的细胞亚型即 Th1 型细胞和 Th2 型细胞。前者可介导慢性迟发型超敏反应性炎症，后者可直接或间接辅助 B 细胞的增殖分化并产生特异性抗体。近年还发现了 CD4/Th17 细胞亚群，据报道其主要参与炎症反应和自身免疫性疾病的发生。临床上做的最多的器官移植是肾移植。肾移植专家认为肾移植慢性排斥以体液免疫为主^[50-53]，是由于循环中持续存在微弱的特异性抗体免疫应答使得移植物功能逐渐下降。

1.2.1 T 细胞与胰岛移植

T 细胞是移植免疫反应中关键的效应性细胞，具有多种分类方式和亚群。根据表达 TCR 的类型，T 细胞可分为 $\alpha\beta$ +、 $\gamma\delta$ +T 细胞，其中 $\alpha\beta$ + T 细胞占绝对优势，达到 95% 以上；根据表面 CD 分子表达情况，T 细胞可分为 CD4+ 和 CD8+T 细胞；根据免疫功能，T 细胞可分为辅助性 (Th)、细胞毒性 (Tc) 和调节性 T 细胞 (Tregs)。根据所处的活化阶段，T 细胞可分为初始 (naïve)、效应 (effector) 和记忆性 (memory) T 细胞。

胰岛移植在临床的广泛应用需解决最重要问题就是免疫调控问题。胰岛移植排斥需要 T 细胞参与介导，因此胰岛移植的免疫调控策略之一是 T 细胞，抑制其增殖活化或诱导其耐受。T 细胞的活化均需要两种信号，即抗原识别信号也即第一信号和激活信号也即第二信号^[54, 55]。T 细胞表面的抗原受体 (TCR) 与自身 APC 表面 (间接识别) 或抗原特异性 APC 表面 (直接识别) 表达的主要

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库